



PCT/R03/02286

REC'D 24 OCT 2003

WIPO

PCT

#2

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 JUL. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**  
**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS**  
**CONFORMÉMENT À LA**  
**RÈGLE 17.1.a) OU b)**

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**

**SIEGE**  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE <b>23 JUL. 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>23 JUL. 2002</b> Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>B1345FR</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  Cabinet SUEUR & L'HELGOUALCH 109, boulevard Haussmann 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	N°
			Date <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)  Utilisation d'une rhéine pour la préparation d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, la prévention et le traitement du rejet des transplantations d'organes et de tissus.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		NEGMA-LERADS	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		4 . 1 . 0 . 1 . 0 . 2 . 0 . 0 . 8	
Code APE-NAF		2 . 4 . 4 . C	
Adresse	Rue	Avenue de l'Europe	
	Code postal et ville	78117	TOUSSUS LE NOBLE
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>75 INPI PARIS</b> LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		0209340	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		B1345FR	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet SUBUR & L'HELGOUALCH	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	109, boulevard Hausmann	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.30.26.30	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.53.30.26.39	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		sueur@compuserve.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Jean L'HELGOUALCH (CPI 92 - 1163)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  L. MARIELLO	

La présente invention concerne le traitement de l'inflammation chronique, et la prévention et le traitement du rejet des transplantations d'organes et de tissus par administration d'une dose efficace de rhéine ou de diacerhéine ou d'un de leurs sels ou esters, ainsi que l'utilisation de la rhéine ou de la diacerhéine ou d'un de leurs sels ou esters pour la fabrication d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, et la prévention et le traitement du rejet des transplantations d'organes et de tissus.

L'inflammation aiguë est un mécanisme physiopathologique responsable de plusieurs formes pathologiques importantes, référencées par exemple dans Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ème édition (1998), 749-754. Un grand nombre d'études ont été consacrées aux médiateurs responsables du déclenchement de l'inflammation, et au contrôle pharmacologique et thérapeutique de l'inflammation dans les phases initiales. Ces études ont permis de produire et mettre sur le marché des médicaments efficaces dans le traitement de l'inflammation aiguë.

Dans des conditions normales, les mécanismes de protection et de réponse de l'organisme peuvent maîtriser les causes de l'inflammation, et arrêter le processus. En effet, les chercheurs ont souvent constaté que le phénomène de l'inflammation, après une première phase aiguë, pouvait s'atténuer ensuite dans une deuxième phase. Cependant, peu d'études ont abordé la question de l'évolution bénigne spontanée de l'inflammation, et de son contrôle pharmacologique et thérapeutique.

En raison de la persistance des causes et/ou de l'inefficacité du traitement, l'inflammation peut devenir chronique. Le passage à la chronicité est fréquent, peut se présenter sous plusieurs aspects pathologiques importants, référencés notamment dans Tarkowski A. et al. Mol. Med. Today (1988) 4:15-18 ; et Levy B.D. et al., Nature Immunol. (2001) 2:612-619. La problématique liée à l'inflammation chronique a

suscité de nombreux travaux de recherche. Cependant, il n'existe aujourd'hui que peu de traitements satisfaisants. De plus, même à faibles doses ces traitements sont souvent mal tolérés par les patients et peuvent provoquer des effets indésirables graves.

Des travaux ont montré l'influence de certains facteurs endogènes dans l'évolution bénigne spontanée de l'inflammation. Ainsi, D. Willis et al. (Nature Medicine (1996) 2: pp. 87-90) ont montré qu'une enzyme, la hème oxygénase-1 (HO-1), est exprimée progressivement dans les phases plus avancées de l'inflammation aiguë et précède la phase de résolution de l'inflammation. Ainsi, un modèle cohérent des événements principaux survenant au cours de l'inflammation est illustré dans la Figure 1 (modèle de pleurite induite après injection de carragénine chez le rat), dans laquelle HO-1, représente le taux de l'hème oxygénase-1, iNOS, la nitric-oxyde synthétase inductible, et PGE<sub>2</sub>, la prostaglandine E<sub>2</sub>. On observe que le taux de l'hème oxygénase croît progressivement avec le temps, et précède la diminution de l'inflammation.

L'hème oxygénase appartient aux "heat-shock proteins" (HSP): elle est connue également sous le nom de "heat-shock protein 32K" (HSP32) (voir Keyse S.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 86:99-103). Les HSP forment une famille de protéines dont l'expression est stimulée par le stress (chaleur, hypoxie, oxydation, intoxication par des métaux, etc.), comme vérifié dans des expérimentations réalisées par la demanderesse *in vitro* sur des cultures de chondrocytes humains et de cartilage isolé de la tête fémorale de rat. La Figure 2 montre les résultats d'un "Western blot" qui analyse l'expression de HSP32 (HO-1) et HSP70 après choc thermique (1 heure à 43°C) dans le modèle du cartilage de tête fémorale de rat (Cont. = contrôle).

Les HSP jouent un rôle très important dans les mécanismes de défense et réparation cellulaire face aux stress. En particulier, la HO-1 exerce un effet modulateur très important

au cours de la réponse inflammatoire: une élévation du taux de l'enzyme s'accompagne d'une suppression de l'inflammation, tandis qu'une inhibition entraîne une augmentation de la réponse inflammatoire (Nature Medicine (1996) 2:87-90).

5 La découverte de la HO-1 et l'appréciation de ses effets ont suggéré la possibilité d'un contrôle pharmacologique et thérapeutique de l'inflammation chronique ; en effet, il serait avantageux de pouvoir disposer de médicaments susceptibles de favoriser et/ou de maintenir l'élévation du  
10 taux de l'enzyme HO-1, à utiliser au cours du traitement de l'inflammation chronique, telle qu'observée chez les patients immunosupprimés.

De plus, les mécanismes cellulaires responsables de l'inflammation chronique interviennent également lors des  
15 phénomènes inflammatoires observés en réponse au transplant d'un tissu (Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ème édition (1998), 1760-68). Donc, il serait aussi avantageux de disposer de médicaments susceptibles de favoriser l'élévation du taux de l'enzyme HO-1 pour protéger l'organisme contre la  
20 dégradation du greffon observée lors de la transplantation de tissus, et à utiliser au cours de la prévention et traitement des rejets de transplants.

Les rhéines et certains de leurs dérivés, y compris la diacerhéine, ont été utilisés en médecine humaine et  
25 vétérinaire comme principes actifs de médicaments. Des procédés de préparation ont été mis au point pour obtenir avec un bon rendement de la diacerhéine de pureté compatible avec l'utilisation dans le domaine pharmaceutique, présentant une très faible teneur en aloémodine et autres impuretés  
30 indésirables.

En médecine humaine, la diacerhéine a été administrée à des patients souffrant d'arthrose, qui présentent des douleurs et des difficultés à se déplacer. par ailleurs, le traitement par la diacerhéine permet de ralentir la progression de la  
35 maladie arthrosique, avec une bonne sécurité d'emploi.

Cependant, la diacerhéine ainsi que la rhéine ont une activité symptomatique anti-inflammatoire et antalgique modérée dans la phase aiguë de l'arthrose (Nguyen et al., Arthritis and Rheumatism (1994) 37:529-536).

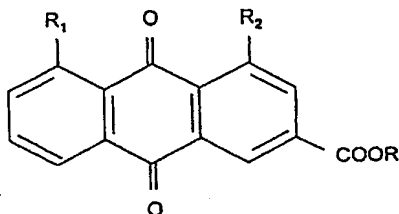
5 Or, les travaux et expérimentations réalisés par la demanderesse, visant à éclaircir le mécanisme d'action de la diacerhéine et de la rhéine, ont montré de manière tout à fait inattendue que la rhéine, la diacerhéine, et leurs sels ou esters ont pour effet de promouvoir significativement la  
10 formation de la HO-1, et de favoriser les mécanismes de contrôle de l'inflammation chronique. On a ainsi pu démontrer que l'administration de rhéine, ou de diacerhéine, ou de leurs sels ou esters, a pour effet de protéger l'organisme contre les événements délétères liés à l'inflammation chronique.

15 De plus, l'administration de rhéine, ou de diacerhéine, ou de leurs sels ou esters, a aussi pour effet de protéger l'organisme contre la dégradation d'organes et tissus, et notamment le cartilage, de la part des cellules inflammatoires, et de contrôler les phénomènes inflammatoires qui  
20 interviennent en réponse aux transplantations d'organes et de tissus, ce qui permet d'envisager leur utilisation dans la prévention et le traitement des rejets de greffes d'organes et de tissus.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation de  
25 la diacerhéine, et plus généralement de la rhéine et des dérivés de rhéine, en thérapeutique humaine et vétérinaire dans le traitement des inflammations chroniques, et pour la prévention et le traitement des rejets de greffes d'organes et tissus.

30 L'invention a aussi pour objet l'utilisation de la rhéine et des dérivés de la rhéine, en particulier la diacerhéine, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, et pour la prévention et le traitement des rejets de greffes d'organes et tissus.

La rhéine et ses dérivés utilisables dans l'invention, notamment la diacerhéine, peuvent être représentés par la formule générale (I) suivante :



10 dans laquelle R représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, par exemple un groupe méthyle, éthyle ou propyle, ou un atome de métal alcalin ou alcalino-terreux, par exemple un atome de sodium, de potassium ou de calcium, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un groupe hydroxy ou un  
15 groupe acyloxy de formule R'-COO- dans laquelle R' est un groupe alkyle de 1 à 4 atomes de carbone, par exemple un groupe méthyle, éthyle ou isopropyle.

Dans la formule générale (I) ci-dessus, R représente de préférence un atome d'hydrogène, et R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent de  
20 préférence un groupe hydroxy ou acétoxy. La formule générale (I) ci-dessus dans laquelle R est un atome d'hydrogène et R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont un groupe acétoxy -COOCH<sub>3</sub> est celle de la diacerhéine.

La diacerhéine et la rhéine peuvent être préparées par  
25 les méthodes connues de la technique, et par exemple à partir de produits d'extraction d'aloès ou de feuille de sénégale, tels que des sennosides, ou par acétylation de barbaloin suivie d'une oxydation par l'oxyde de chrome. On peut aussi utiliser les procédés de synthèse décrits dans les brevets EP 801639 et  
30 EP 909268. Ces procédés consistent, par exemple, à effectuer une réaction de Diels-Alder sur une naphtoquinone telle que la juglone au moyen d'un diène acyclique pour obtenir une tétrahydroanthraquinone qui peut être aisément transformée en rhéine et diacerhéine après déprotection oxydante.



La diacerhéine obtenue par ces procédés peut être purifiée si nécessaire pour parvenir à un produit répondant parfaitement aux normes pharmaceutiques et offrant toutes les garanties voulues. Par exemple, on peut utiliser le procédé de  
5 purification décrit dans le brevet EP 754173, suivant lequel on prépare un sel soluble de diacerhéine par action de triéthylamine et d'acétate de potassium, puis on effectue une hydrolyse en milieu faiblement acide.

Les études effectuées par la demanderesse pour mettre en  
10 évidence l'effet de la diacerhéine, de la rhéine et de leurs sels ou esters sur la HO-1 ont été réalisées en utilisant des modèles validés, comme indiqué ci-après.

Les travaux et expérimentations in vitro ont utilisé les modèles suivants:

15 1.- Un modèle validé de culture de tissu, et notamment le cartilage de tête fémorale de rat, traité avec érythrocytes (en % w/v), lysat d'érythrocytes ( $3 \times 10^6$ ), ou hémoglobine (en % w/v), sans et après stress thermique (1h à 43°C). L'intégrité du cartilage a été mesurée par l'incorporation de  
20 sulfate radioactif ( $^{35}\text{SO}_4$ ; en coups per minutes, CPM). Dans ce modèle, les érythrocytes, le lysat d'érythrocytes et l'hémoglobine provoquent la destruction cellulaire, démontrée par une diminution de la viabilité cellulaire et de l'incorporation de sulfate radioactif par les cellules, comme le  
25 montrent les Figures 3 et 4.

La Figure 3 montre que les érythrocytes provoquent une destruction cellulaire en fonction de leur dose, mise en évidence par la diminution de l'incorporation cellulaire de sulfate radioactif (modèle: cartilage de tête fémorale de rat  
30 avec érythrocytes en %v/v; Cont. = contrôle: solution sans érythrocytes;  $^{35}\text{SO}_4$  = sulfate radioactif; sem = erreur standard).

De la même manière, la Figure 4 montre que l'hémoglobine provoque une destruction cellulaire en fonction de sa dose,  
35 mise en évidence par la diminution de l'incorporation

cellulaire de sulfate radioactif (modèle: cartilage de tête fémorale de rat avec hémoglobine en %v/v; Cont. = contrôle: solution sans hémoglobine;  $^{35}\text{SO}_4$  = sulfate radioactif; sem = erreur standard).

5 Dans ce modèle de culture de tissu, les HSP préalablement induites par le stress préviennent la destruction cellulaire, comme démontré sur la Figure 5 par une augmentation de l'incorporation de sulfate radioactif par les cellules (modèle: cartilage de tête fémorale de rat soumis à stress  
10 thermique (1h à 43°C) et ensuite traité avec hémoglobine (1%w/v);  $^{35}\text{SO}_4$  = sulfate radioactif; sem = erreur standard).

2.- Un modèle validé de culture de cellules, et notamment les chondrocytes humains, traités avec érythrocytes (en %w/v), lysat d'érythrocytes ( $3 \times 10^6$ ), ou hémoglobine (en % w/v), sans  
15 et après stress thermique (1h à 43°C). L'intégrité cellulaire a été mesurée par la viabilité cellulaire (cellules vivantes par rapport au contrôle), la présence d'apoptose (fragmentation nucléaire; en nombre et pourcentage par rapport au contrôle), et l'incorporation de sulfate radioactif ( $^{35}\text{SO}_4$ ; en  
20 coups per minutes, CPM).

Comme déjà observé pour le cartilage de tête fémorale, dans ce modèle aussi les érythrocytes, le lysat d'érythrocytes ou l'hémoglobine provoquent la destruction cellulaire. Par contre, les HSP induites par un stress préviennent cette  
25 destruction cellulaire et préservent les cellules, comme le montre la Figure 6 qui dénombre les cellules vivantes (modèle: chondrocytes humains soumis à stress thermique (1h à 43°C) et ensuite traité avec lysat d'érythrocytes ( $3 \times 10^6$ ); sem = erreur standard).

30 Sur la base de ces expériences, les études effectuées par la demanderesse ont mis en évidence les effets de la diacerhéine, de la rhéine et de leurs sels ou esters sur l'expression de la HO-1, comme illustré en détail ci-après en référence à la Figure 7.

La Figure 7 est un "Western blot" (modèle: cartilage de tête fémorale de rat; Cont. = contrôle; Veh. = solution témoin; diacerhéine: 10 $\mu$ M et 100 $\mu$ M) qui montre que la diacerhéine, par comparaison avec le contrôle et la solution témoin, entraîne une augmentation de l'expression de la HO-1 en fonction de la dose.

En utilisant les modèles *in vitro* décrits ci-dessus, les études effectuées par la demanderesse ont aussi démontré que la diacerhéine, la rhéine et leurs sels ou esters, en raison de leur effet sur la HO-1, préservent l'intégrité cellulaire, comme illustré en détail sur les Figures 8 et 9.

La Figure 8 (modèle: chondrocytes humains; lysat = produit de la lyse de 3x10<sup>6</sup> érythrocytes; diacerhéine: 100 $\mu$ M; sem = erreur standard) montre que le traitement par la diacerhéine prévient la destruction cellulaire provoquée par le lysat d'érythrocytes.

La Figure 9 (modèle: chondrocytes humains; lysat = produit de la lyse de 3x10<sup>6</sup> érythrocytes; rhéine: 100 $\mu$ M; sem = erreur standard) montre que le traitement par la rhéine prévient l'apoptose provoquée par le lysat d'érythrocytes.

Les conclusions principales des travaux et expérimentations réalisés par la demanderesse *in vitro* avec les modèles décrits ci-dessus, sur les effets de la diacerhéine, de la rhéine et de leurs sels ou esters, sont les suivantes:

- La diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters augmentent de façon dose - dépendante les niveaux de l'enzyme HO-1 qui joue un rôle dans la protection de l'intégrité cellulaire;

- Grâce à cette augmentation de la HO-1, la diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters préservent l'intégrité des cellules et des tissus face aux réactions délétères induites par le stress et l'inflammation;

- La diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters préviennent l'apoptose (fragmentation du noyau, suivi par la destruction et la mort des cellules).

La demanderesse a également réalisés des travaux et expérimentations in vivo, avec l'utilisation du modèle décrit ci-après.

On a mesuré l'effet de la diacerhéine, de la rhéine et de leurs sels ou esters sur l'intensité de la réponse inflammatoire tissulaire et des phénomènes de destruction et rejet à la suite de l'implantation d'un tissu, en utilisant le modèle du granulome et dégradation de tissu de rat induites chez la souris (Bottomley KM et al., Osteoarthritis and Cartilage (1998) 6: 19-23.).

La méthode comprend les étapes suivantes :

- les tissus isolés (rat Wistar, mâle), sont placés dans du coton stérile et implantés en sous - cutané chez des souris TO;
- les implants sous - cutanés sont conservés sur une période de 2 semaines;
- traitement quotidien des animaux avec diacerhéine, rhéine et leurs sels ou esters, ainsi qu'avec les contrôles et comparateurs, aux doses optimales indiquées;
- récupération du tissu implanté et du granulome réactif;
- mesure du degré de la réponse inflammatoire tissulaire (évaluation des dimensions du granulome, du nombre de cellules inflammatoires dans l'exsudat, et du volume de l'exsudat), et du rejet (évaluation de la dégradation du tissu implanté).

En utilisant le modèle décrit ci-dessus, les études effectuées par la demanderesse ont démontré que la diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters diminuent la réponse inflammatoire tissulaire (granulome, nombre de cellules inflammatoires, exsudat) provoquée par la transplantation de tissu de rat chez la souris, et préservent l'intégrité du tissu transplanté, comme illustré en détail sur les Figures 10, 11 et 12 ci-après.

La Figure 10 montre que le traitement avec la diacerhéine diminue la réaction inflammatoire tissulaire (formation du granulome réactif) en fonction de la dose (diacerhéine: 5, 15

et 50 mg/kg, par voie orale; \*\* différence statistiquement significative par rapport au contrôle :  $p < 0,01$ ).

La Figure 11 montre que la réaction inflammatoire tissulaire provoquée par l'implantation de tissu de rat chez la souris est diminuée par le traitement avec la diacerhéine en fonction de la dose (à gauche sur la Figure 11: nombre de cellules inflammatoires ; à droite : volume de l'exsudat) (Cont.: contrôle; diacerhéine : 5, 15 et 50 mg/kg, par voie orale; \* différence statistiquement significative par rapport au contrôle :  $p < 0,05$ ).

La Figure 12 montre que le traitement avec la diacerhéine préserve l'intégrité du tissu transplanté en fonction de la dose de diacerhéine, ce qui est mis en évidence par la conservation de la teneur en collagène (à gauche sur la Figure 12) et en glycosamino-glycane (GAG; à droite) dans le tissu transplanté (diacerhéine: 5, 15 et 50 mg/kg, par voie orale; différences statistiquement significatives versus contrôle : \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Les conclusions principales des travaux et expérimentations sur les effets de la diacerhéine, de la rhéine, et de leurs sels ou esters réalisés *in vivo* par la demanderesse avec le modèle décrit ci-dessus sont les suivantes:

- la diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters diminuent la réaction inflammatoire tissulaire (dimensions du granulome, nombre de cellules inflammatoires, volume de l'exsudat) provoquée par l'implantation du tissu de rat dans la souris ;

- la diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters préservent l'intégrité des tissus transplantés face à l'inflammation tissulaire réactive ;

- la diacerhéine, la rhéine, et leurs sels ou esters préviennent la destruction et le rejet du tissu transplanté.

Pour le traitement de l'inflammation aiguë, les médicaments le plus largement utilisés sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), même s'ils présentent

certaines effets indésirables, et en particulier une tendance à induire des ulcérations gastriques ou intestinales (Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics; 9ème édition, McGraw Hill). Ces effets indésirables sont liés à l'inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase-1 (COX-1; isoforme constitutive).

La découverte de l'existence d'une autre isoforme de l'enzyme cyclo-oxygénase, la cyclo-oxygénase-2 (COX-2; isoforme induite dans l'établissement de l'inflammation), a ouvert de nouvelles perspectives vers la mise au point de médicaments potentiellement plus spécifiques et plus sûrs. Les AINS disponibles aujourd'hui ont pour effet d'inhiber sélectivement l'action de la COX-2, et donc d'agir sur l'inflammation avec une incidence plus faible d'effets secondaires indésirables sur le tractus gastro-intestinal supérieur. Ainsi, une nouvelle classe de médicaments, les inhibiteurs de COX-2 tels que le celecoxib et le rofecoxib, a été développée pour le traitement symptomatique des maladies inflammatoires.

Cependant, à ce jour aucun effet favorable sur l'enzyme hème oxygénase n'a été observé ni pour les AINS "classiques" ni pour les inhibiteurs de COX-2.

Les études réalisées par la demanderesse ont confirmé que les AINS classiques ainsi que les inhibiteurs de COX-2 diminuent la réponse inflammatoire tissulaire (granulome, nombre de cellules inflammatoires, exsudat) provoquée par la transplantation de tissu de rat chez la souris. Par contre, ni les AINS classiques, ni les inhibiteurs de COX-2, ne préservent l'intégrité du tissu transplanté, contrairement à la rhéine et la diacerhéine, comme les montrent les Figures 13, 14 et 15 ci-jointes.

La Figure 13 montre la comparaison des effets du traitement avec un inhibiteur de COX-2 (le rofecoxib) d'une part, et la diacerhéine d'autre part, sur la diminution de la réaction inflammatoire tissulaire (formation du granulome

réactif) provoquée par l'implantation de tissu de rat chez la souris (diacerhéine: 5, 15 et 50 mg/Kg, et rofecoxib: 3 mg/kg, par voie orale; différences statistiquement significatives par rapport au contrôle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

5 La Figure 14 permet de comparer les effets du traitement avec le rofecoxib d'une part, la diacerhéine d'autre part, sur la diminution de la réaction inflammatoire tissulaire provoquée par l'implantation de tissu de rat chez la souris. Le graphique de gauche illustre le nombre de cellules inflammatoires, et celui de droite le volume de l'exsudat (Cont.: contrôle; DAR : diacerhéine: 2, 10 et 50 mg/kg, et rofecoxib: 3 mg/Kg, par voie orale; différence statistiquement significative par rapport au contrôle: \*  $p < 0,05$ ).

15 La Figure 15 permet de comparer les différences des effets du traitement avec le rofecoxib d'une part, la diacerhéine d'autre part, sur la préservation de l'intégrité du tissu transplanté. Le graphique de gauche correspond à la teneur en collagène, celui de droit à la teneur en glycosamino-glycane (GAG) dans le tissu (diacerhéine: 5, 15 et 20 50 mg/Kg, et rofecoxib: 3 mg/Kg, par voie orale; différences statistiquement significatives versus contrôle: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Les résultats obtenus montrent que la diacerhéine et la rhéine ont des propriétés significativement différentes de 25 celles des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) classiques et de celles des inhibiteurs de COX-2, notamment sur la préservation d'un tissu transplanté et le rejet de ce tissu.

Conformément à la présente invention, il peut être utile d'associer la diacerhéine, ou la rhéine, ou leurs sels et 30 esters, à un AINS classique ou à un inhibiteur de COX-2, dont les actions peuvent être complémentaires, selon la pathologie traitée. Ainsi la diacerhéine peut être associée à un AINS tel que le diclofenac à une dose comprise entre 25 et 150 mg par jour, ou à un inhibiteur de COX-2 comme le rofecoxib à une 35 dose comprise entre 10 et 50 mg par jour.

Comme indiqué précédemment, la diacerhéine, la rhéine, ainsi que leurs sels et esters, peuvent être avantageusement utilisés pour le traitement des inflammations chroniques et pour la prévention et le traitement du rejet des trans-  
 5 plantation de tissus et d'organes. A titre d'exemple, leur utilisation aux doses indiquées est tout particulièrement utile pour le traitement des affections indiquées ci-après.

- les inflammations associées au diabète Type I et II, telles que neuropathie périphérique et ulcère chronique cutané

10 - la dégénérescence maculaire

- la rétinite,

- l'uvéite intermédiaire ou postérieure non infectieuse

- le glaucome

- les "connectivites" (comme le lupus érythémateux, la  
 15 sclérodermie, la sarcoïdose)

- l'érythème noueux et la dermite atopique de l'adulte, en cas d'inefficacité, intolérance ou contre-indication des traitements classiques (photothérapie et/ou photochimiothérapie)

20 - la myasténie et la mucoviscidose

- la sinusite chronique, la bronchite chronique obstructive, les bronchiéctasies

- la tuberculose (avec ses localisations pulmonaire, rénale, osseuse) et la prévention de la formation du granulome  
 25 (comme dans les parasitoses, la leishmaniose, la pneumoconiose)

- l'hépatite chronique (d'origine virale, alcoolique), la pancréatite chronique

- la glomérulonéphrite, le syndrome néphrotique et la  
 30 toxémie ("urémie") du patient en dialyse rénale

- les infections opportunistes de patients immunosupprimés et "grands brûlés", l'ostéomyélite

- les anémies hémolytiques, la drépanocytose, l'hémarthrose



- le développement de la plaque athéromateuse, l'ictus hémorragique, la thrombophlébite

- l'aplasie médullaire acquise (même si bénéficiant d'une greffe de moelle osseuse allogénique)

5       - la prévention du rejet d'un tissu (cartilage, peau, moelle osseuse) ou organe (foie, rein, cœur) transplanté

10       - la prévention du rejet du greffon, et du rejet après greffe, y compris à la phase initiale de transplantation hépatique, ainsi que le traitement préventif ou curatif de la maladie du greffon contre l'hôte

      - le traitement du rejet, notamment chez des patients initialement traités par des protocoles immunosuppresseurs.

15       La diacerhéine et la rhéine possèdent une faible solubilité dans l'eau et dans les alcools, et sont donc de préférence administrées par voie orale. Les formes d'adminis-  
tration par voie orale usuelles dans le domaine pharmaceu-  
tiques sont adéquates, et par exemple, on peut administrer le  
médicament sous forme de comprimés, de gélules ou de capsules  
molles de gélatine, ou toute autre forme galénique appropriée.

20       Une forme d'administration particulièrement appropriée est celle décrite dans le brevet EP 862423 décrivant des capsules ou gélules dans lesquelles la diacerhéine est  
mélangée à une huile liquide et un surfactif non ionique, permettant d'obtenir une bonne biodisponibilité. Une autre  
25       forme utilisable dans l'invention, décrite dans le brevet US 6124358, est préparée par comicronisation de la rhéine ou de la diacerhéine avec un lauryl sulfate, par exemple le lauryl sulfate de sodium.

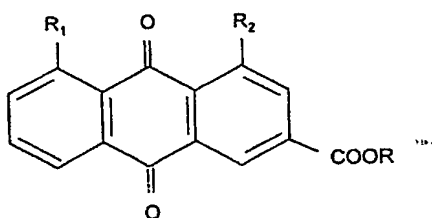
30       La posologie est déterminée par le praticien en fonction de l'état du patient, mais elle est généralement comprise entre 25 mg et 500 mg par jour, de préférence entre 50 mg et 100 mg par jour. Elle est relativement indépendante du poids du patient, chez l'adulte. Les doses unitaires, pour adminis-  
tration par voie orale, sont généralement comprises entre  
35       25 mg et 50 mg.

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation de la rhéine et de dérivés de rhéine en thérapeutique humaine ou vétérinaire pour le traitement de l'inflammation chronique, le traitement et la prévention des rejets de transplants.

5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la rhéine et le dérivé de rhéine sont représentés par la formule générale (I) :

10



15 dans laquelle R représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, ou un atome de métal alcalin ou alcalino-terreux, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un groupe hydroxy ou un groupe acyloxy de formule R'-COO- dans laquelle R' est un groupe alkyle de 1 à 4 atomes de carbone.

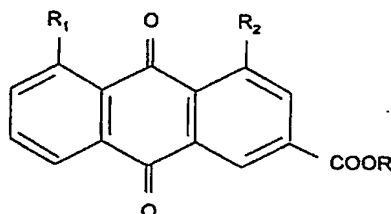
20 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le dérivé est la rhéine ou la diacerhéine.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le dérivé de rhéine est administré à raison de 25 à 500 mg par jour.

25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le dérivé de rhéine est sous forme administrable par voie orale.

6. Utilisation de la rhéine et de dérivés de rhéine pour la fabrication d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, le traitement et la prévention des rejets de transplants.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la rhéine et le dérivé de rhéine sont représentés par la formule générale (I) :



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, ou un atome de métal alcalin ou alcalino-terreux,  $R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents, représentent un groupe hydroxy ou un groupe acyloxy de formule  $R'-COO-$  dans laquelle  $R'$  est un groupe alkyle de 1 à 4 atomes de carbone.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le dérivé est la rhéine ou la diacerhéine.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que le dérivé de rhéine est administré à raison de 25 à 500 mg par jour.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce que le dérivé de rhéine est sous forme administrable par voie orale.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la dose unitaire est comprise entre 25 mg et 50 mg.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisée en ce que le dérivé de rhéine est associé à un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou à un inhibiteur de COX-2.

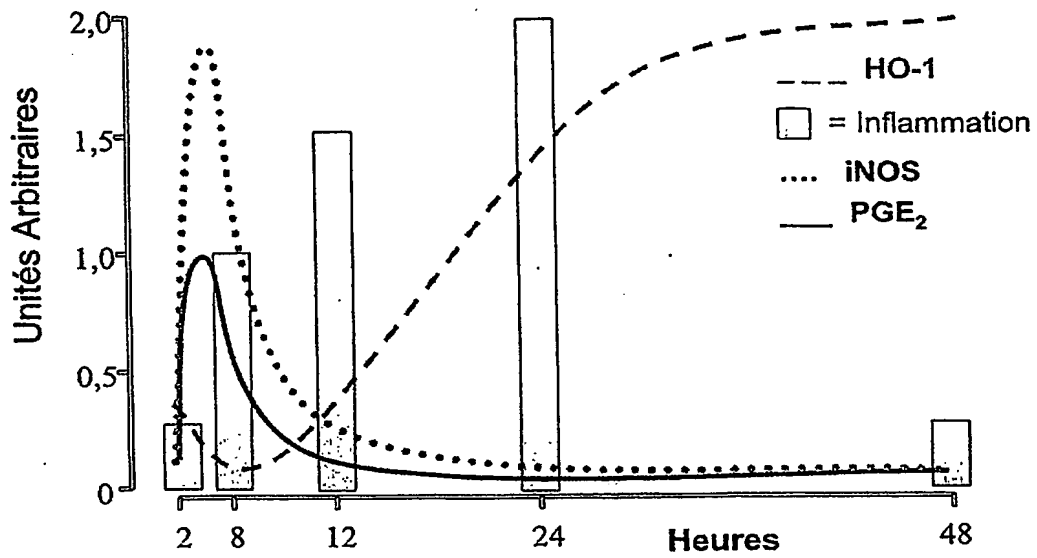


Figure 1

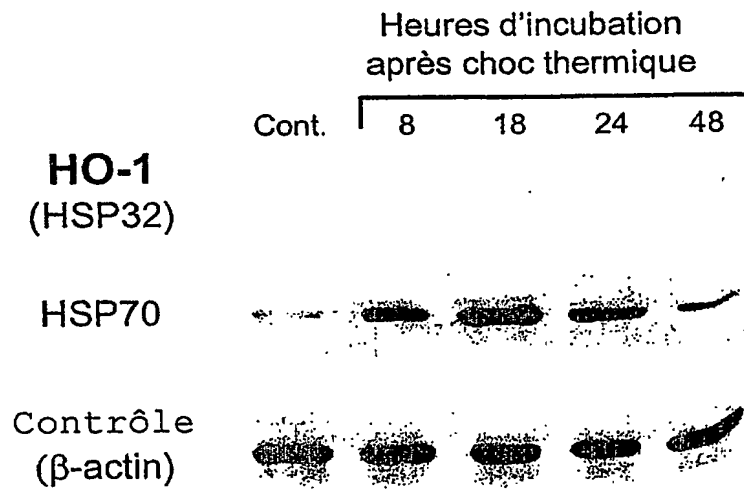


Figure 2

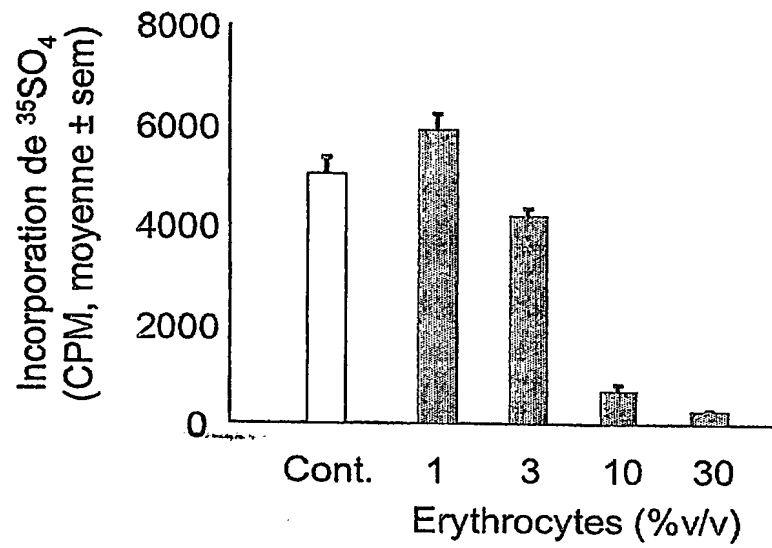


Figure 3

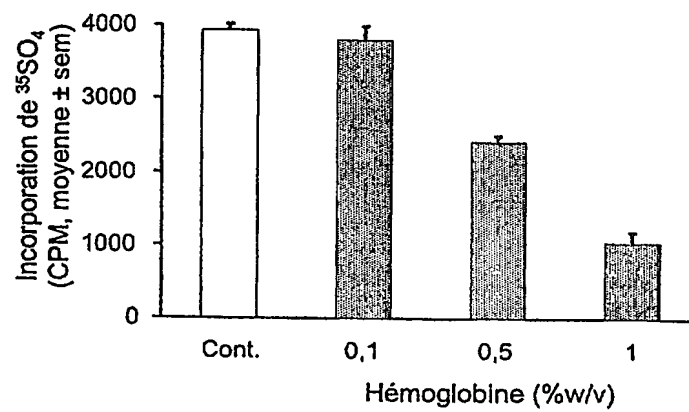


Figure 4

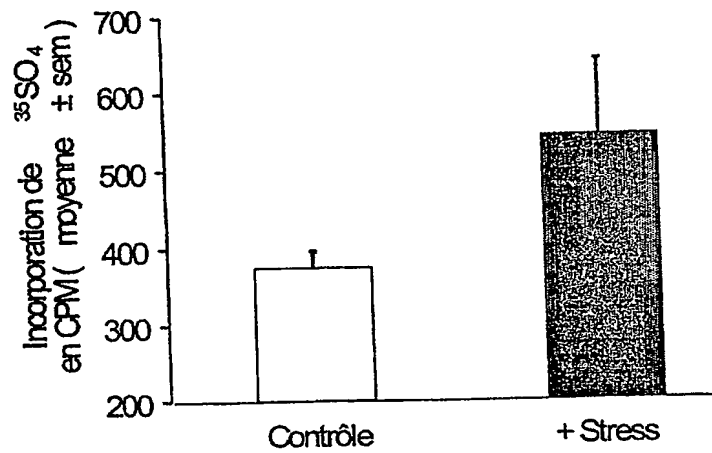


Figure 5

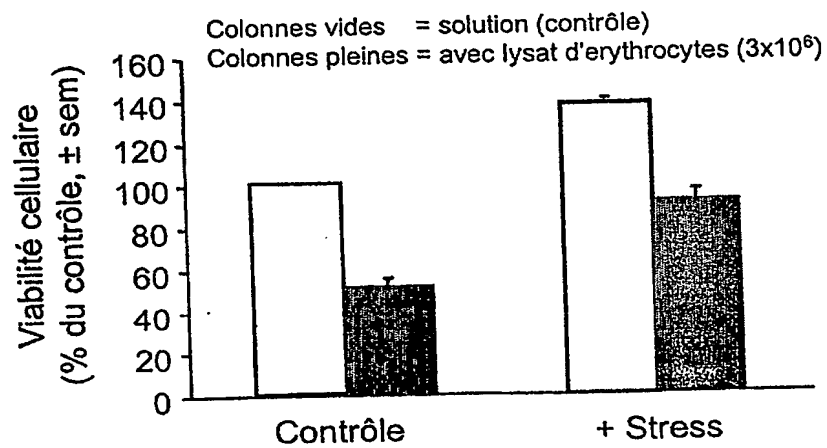


Figure 6

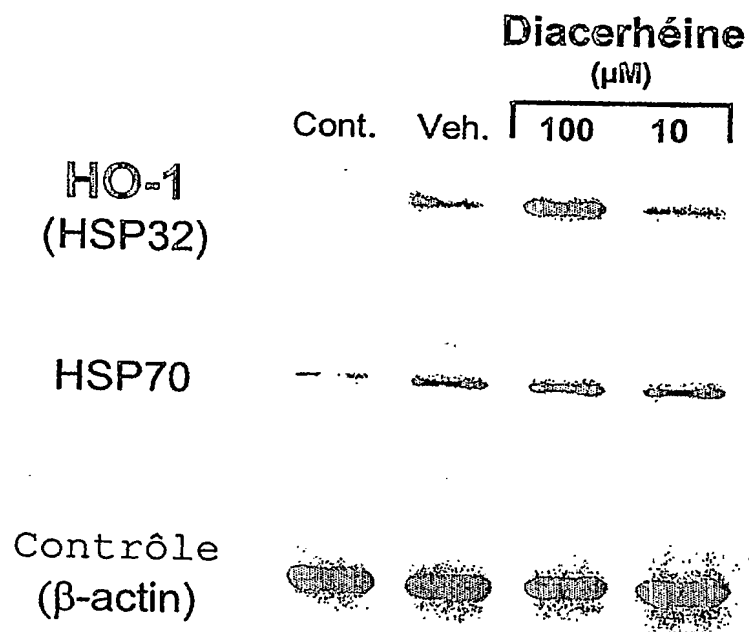


Figure 7

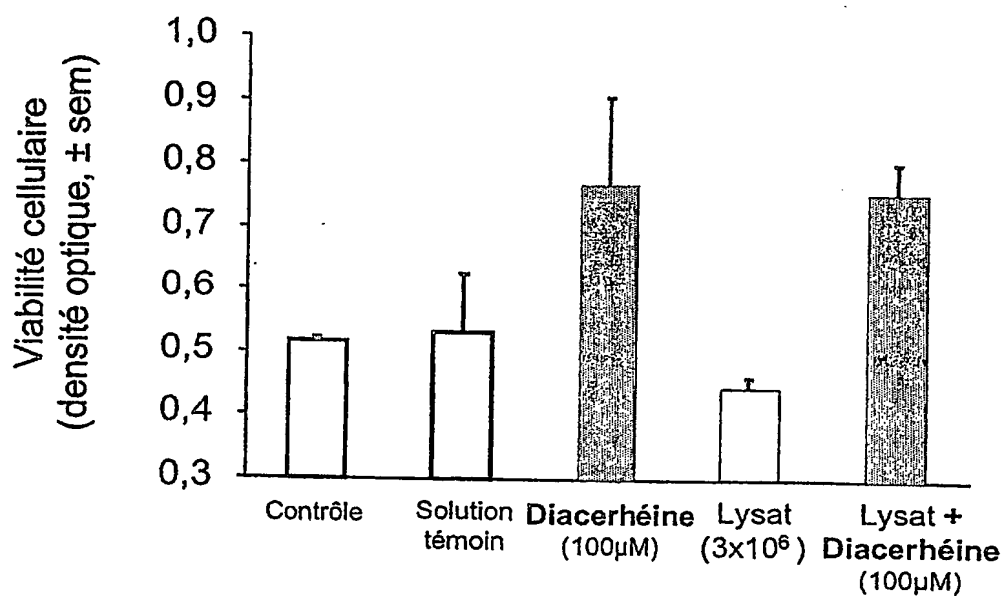


Figure 8

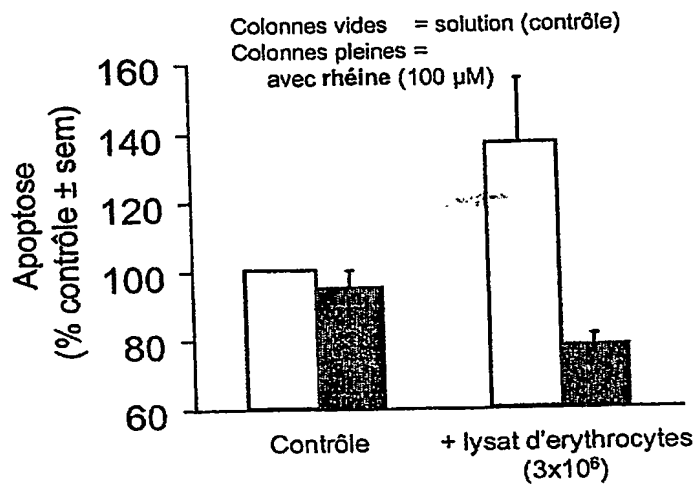


Figure 9

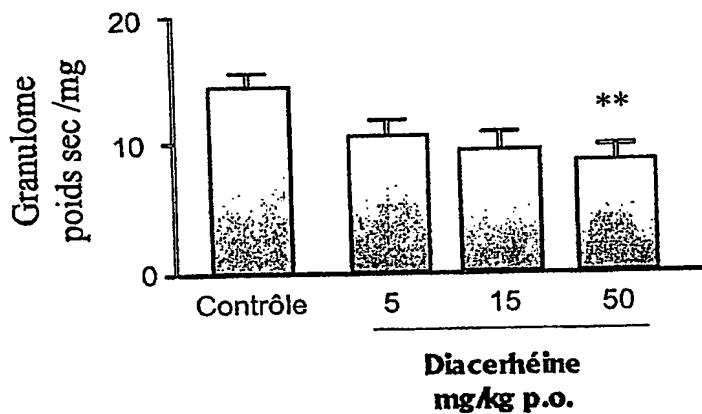


Figure 10



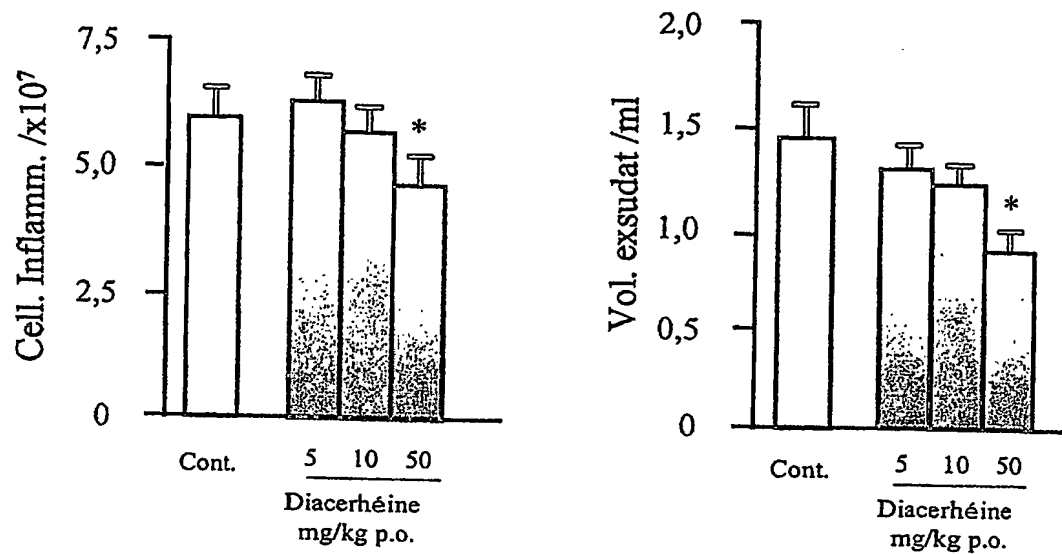


Figure 11

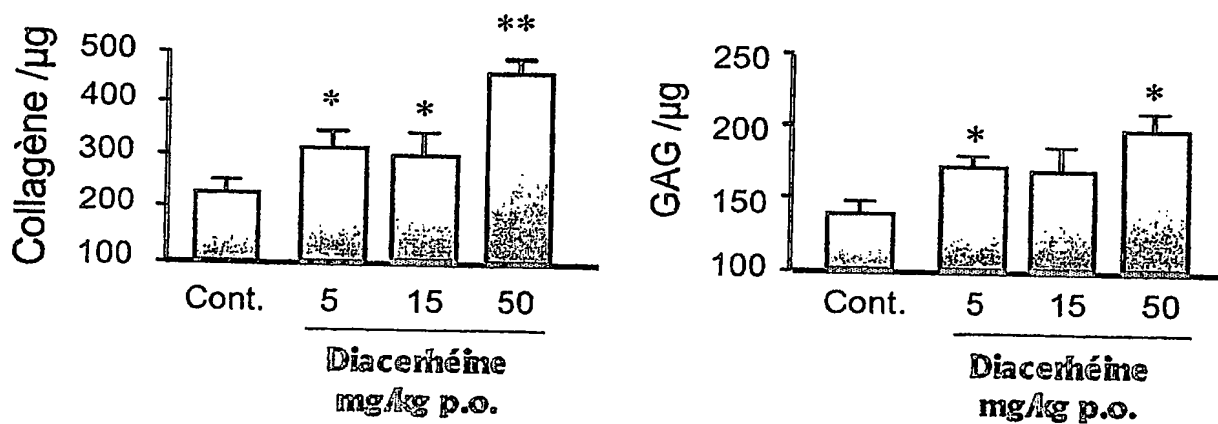


Figure 12

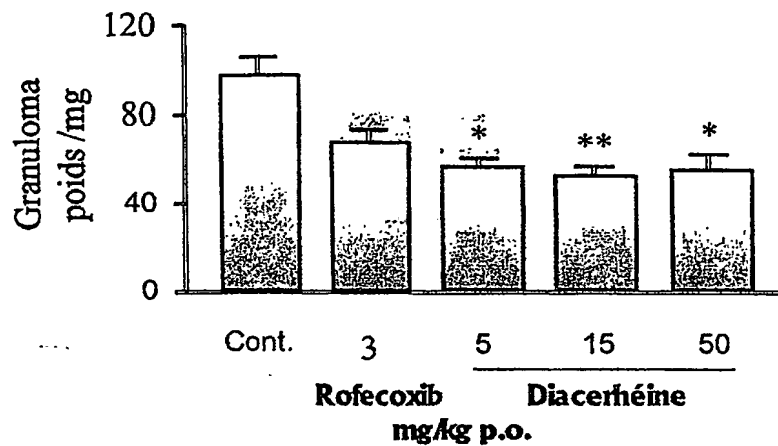


Figure 13

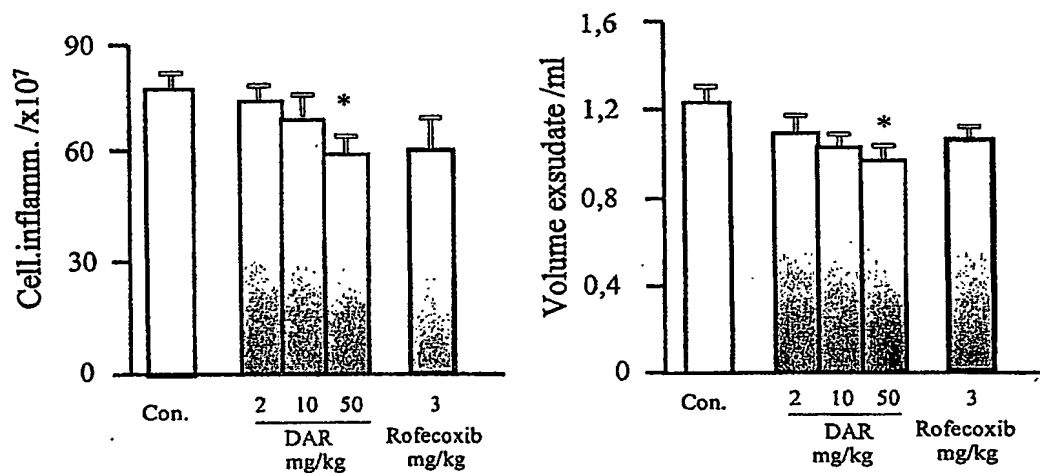


Figure 14

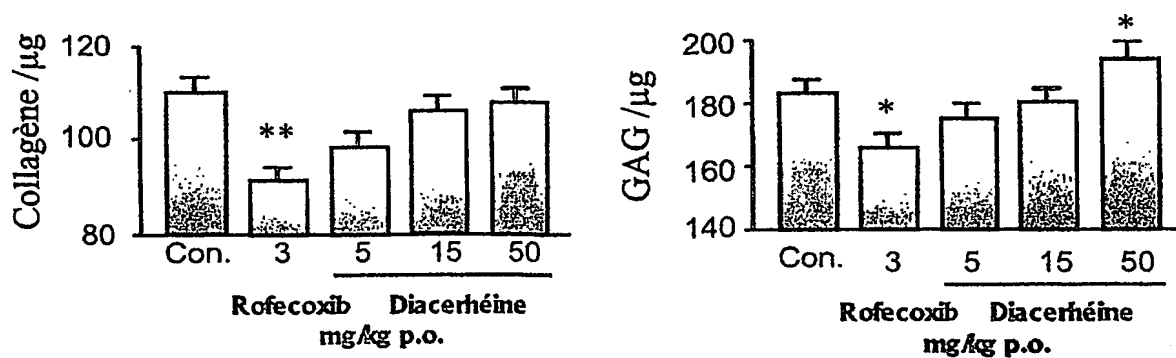


Figure 15


**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.**  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B1345FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0209340	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  Utilisation d'une rhéine pour la préparation d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, la prévention et le traitement du rejet des transplantations d'organes et de tissus.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  NEGMA LERADS Avenue de l'Europe 78117 TOUSSUS LE NOBLE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		CHARBIT	
<b>Prénoms</b>		Suzy	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	10, rue Floris Osmond	
	<b>Code postal et ville</b>	94000	CRETEIL
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		FICHEUX	
<b>Prénoms</b>		Hervé	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	26bis, boulevard de Strasbourg	
	<b>Code postal et ville</b>	94130	NOGENT SUR MARNE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		PROVVEDINI	
<b>Prénoms</b>		Diego	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	55, rue Jacques Kellner	
	<b>Code postal et ville</b>	78380	BOUGIVAL
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Jean L'HELGOUALCH (CPI 92 - 1163)			



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2. / 2. .  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B1345FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0209340	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  Utilisation d'une rhéine pour la préparation d'un médicament pour le traitement de l'inflammation chronique, la prévention et le traitement du rejet des transplantations d'organes et de tissus.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  NEGMA LERADS Avenue de l'Europe 78117 TOUSSUS LE NOBLE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		SCHUTZE	
<b>Prénoms</b>		François	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	4, rue Charles Baudelaire	
	<b>Code postal et ville</b>	78860	ST NOM LA BRETECHE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Jean L'HELGOUALCH (CPI 92 - 1163)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Rest Available Copy